فصلنامه علمی
دورهٔ ۱، شمارهٔ ۱، زمستان ۱۳۹۱، صفحه ۳۹-۵۱

زیست توده و رشد جلبک سبز کلروکوکوم (*Chlorococcum* sp.) با استفاده از کودهای آلی و عصاره خاک

امیدوار فرهادیان[1*]، سیدمجتبی فلاحی[2] و نصرالله محبوبی صوفیانی[3]

۱- استادیار، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
۳- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۱۷ پذیرش : ۱۳۹۱/۰۹/۲۵

*- نویسنده مسئول مقاله: omfarhad@cc.iut.ac.ir و Email: farhadyo@yahoo.com

چکیده:
به‌منظور تعیین تأثیر کودهای مرغی و گاوی در پرورش جلبک سبز کلروکوکوم (*Chlorococcum* sp.)، آزمایشی در شش تیمار شامل ۰/۱، ۰/۴، ۰/۸ گرم در لیتر کود مرغی و ۰/۱، ۰/۴، ۰/۸ گرم در لیتر از کود گاوی با سه تکرار در طرح کاملاً تصادفی به‌مدت ۲۸ روز اجرا شد. نتایج نشان داد میانگین بالاترین تراکم سلولی ($۸۷/۱\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر)، میزان رشد ویژه (۰/۰۵۴ در روز)، بیوماس خشک جلبکی (۰/۶۴۴گرم در لیتر)، کلروفیل *a* (۹/۴۲ میلی‌گرم در لیتر) در پرورش با کود مرغی با غلظت ۰/۸ گرم در لیتر است. به‌منظور مقایسه عملکرد این کودها با سایر محیط‌کشت‌ها، آزمایش دوم با پنج تیمار شامل محیط-کشت BBM[1] (شاهد)، BBM + عصاره خاک، کود مرغی ۰/۸ گرم در لیتر، کود گاوی ۰/۸ گرم در لیتر، و مخلوطی از تمام تیمارها (BBM + عصاره خاک + کود مرغی + کود گاوی به نسبت‌های مشابه) به مدت ۱۵ روز با سه تکرار به‌صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج مقایسه‌ها نشان داد که عصاره خاک + BBM، بالاترین تراکم جلبک ($۱۱/۶\times۱۰^{۶}$سلول در هر میلی‌لیتر) و بیشترین میزان زیست توده (۰/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، میزان رشد ویژه (۰/۱۳ در روز)، میزان کلروفیل *a* (۱۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین زمان دو برابر شدن جمعیت (۴/۹۷ روز) را داشت. درجمع‌بندی نهایی، عملکرد عصاره خاک + BBM در تولید زیست توده و رشد جلبک سبز کلروکوکوم مناسب‌تر است.

کلید واژگان: جلبک سبز *Chlorococcum*، کودهای مرغی و گاوی، محیط‌کشت BBM، عصاره خاک، میزان رشد ویژه، زیست توده، کلروفیل *a*.

1. Bold's Basal Medium

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

مقدمه

منابع تجدیدشونده انرژی منابع بومی[1] هستند که پتانسیل فراهم آوردن انرژی را بدون آلودگی هوا و گازهای گلخانه‌ای دارند. در حال حاضر منابع انرژی تجدید شونده ۱۴٪ از تقاضای جهانی انرژی را تأمین می‌کند، در حالی‌که منابع آبی ۲۰٪ از انرژی الکتریکی جهان را تأمین می‌کند. حفاظت و استفاده اصولی از منابع تجدید شونده لازمهٔ توسعه پایدار است (Hall et al., 1993). یکی از منابع مهم تأمین انرژی از دیرباز زیست‌توده[2] می‌باشد که شامل بقایای کشاورزی و جنگلی، جلبک‌ها، علف‌ها، کودهای جانوری، مواد زائد آلی و مواد زیستی‌اند. به‌طور سنتی زیست توده در پختن و تولید گرما بخصوص در کشورهای در حال توسعه در مناطق روستایی استفاده می‌شود. در حال حاضر زیست توده تنها ۳٪ از مصرف انرژی اولیه در کشورهای صنعتی را دارد. در کشورهای آسیای میانه سهم بیوماس در مصرف انرژی ۰/۳٪ است (Demirbas and Demirbas, 2010).

امروزه زیست توده جلبکی به‌طور اصلی به‌عنوان غذای دام و آبزیان پرورشی و کودهای زیستی استفاده می‌شود. علاوه بر این، زیست توده جلبکی را می‌توان طی فرایندهای پیرولیز[3] و تخمیر[4] برای تولید نفت[5]، گاز[6]، هیدروژن[7]، متان[8] و سایر منابع انرژی استفاده کرد (Demirbas, 2006; 2007; 2008; Demirbas and Demirbas, 2010). برای مثال تولید سوختهای زیستی[9] در کشور آلمان در سال ۲۰۰۷ حدود ۲۸۹۰ میلیون تن بود و در سال ۲۰۰۸ به ۵۳۰۲ میلیون تن رسید که نشان‌دهندهٔ اهمیت کنونی این منابع انرژی متکی بر بیوماس جلبکی است. در هر شکل، تولید سوخت‌های زیستی از جلبک‌های میکروسکوپی مقادیر زیادی زیست توده لازم دارد (Demirbas and Demirbas, 2010).

علاوه بر نقش‌های بیان‌شده، کاربردهای متنوع و شگفت‌انگیز جلبک‌ها در تغذیه، پزشکی و خواص درمانی، منابع آبزی‌پروری و کاغذسازی در تکنولوژی‌های نوین محیط‌زیست و تصفیه‌خانه‌های آب به‌عنوان جاذب‌های زیستی مفید باعث شده تا جلبک‌ها بیش از گذشته مورد توجه و مطالعه قرار گیرند. آنها تولیدکنندگان اولیه غالب در اغلب محیط‌های آبی‌اند و عمده انرژی را برای بسیاری از شبکه‌های غذایی آب فراهم می‌کنند. جلبک‌ها به دلیل تأمین منابع غذایی کامل برای لاروهای آبزیان در آغاز زندگی‌شان، عموماً بهترین غذای زنده برای استفاده در پرورش آبزیان‌اند. وجود اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، کارتنوییدها و مواد مغذی مورد نیاز لاروها در جلبک‌ها بر اهمیت استفاده از آنها می‌افزاید (Barsanti and Gualtieri, 2006).

به‌طور کلی تولید ۹۹/۹٪ از بیوماس جلبکی به قابلیت دسترسی ۶ عنصر عمده کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، سولفور و فسفر بستگی دارد. کربن نقش بسیار مهمی در چرخه رشد جلبک‌ها ایفا می‌کند. بعد از کربن، نیتروژن مهمترین نقش را در تولید زیست توده دارد (Barsanti and Gualtieri, 2006).

جنس کلروکوکوم *Chlorococcum* از جلبکهای سبز در آبهای شیرین است که به خانواده Chlorococcaceae و رده Chlorophyceae تعلق دارد. این جلبک توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۷ توصیف شده است. کلروکوکومها در هر دو محیط آبی و خاکی زندگی می‌کنند و دارای یک تا چند کلروپلاست به همراه پیرونوییید فرد ستاره‌ای شکل‌اند که از مشخصات سلولی آنهاست. اندازهٔ

1. Indigenous Resources
2. Biomass
3. Pyrolysis
4. Fermentation
5. Bio-Oil
6. Bio-Gas
7 . Bio-Hydrogen
8. Bio-Methane
9. Biodisel

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

سلولهای کلروکوکوم بین ۷/۸ تا ۱۵/۲ میکرون و رنگ آن سبز است و به صورت تکی یا کلنی وجود دارد (Bold and Parker, 1962; Akiyama, 1977; Becker, 1994; McNuff, 2007). اسپورهای کلروکوکوم در شرایط نامساعد و تاریکی حیات خود را حفظ می‌کنند و زمانی که در شرایط مساعد رشد در آب شیرین قرار می‌گیرند قادر به تشکیل هزاران سلول جدیدند.

جلبک کلروکوکوم را می‌توان با استفاده از محیط‌کشت‌های شیمیایی A۹ و BBM پرورش داد (Lee and Pirt, 1981; Phang and Chu, 1999; Yuan et al., 2002)، اما با توجه به ضرورت پرورش انبوه جلبک‌ها استفاده از مواد شیمیایی توجیه اقتصادی مناسبی ندارد. برای رفع چنین مشکلی با توجه به اینکه کودهای آلی دارای نیتروژن و فسفرند در تأمین مواد مغذی مناسب برای رشد جلبک‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. این کودها علاوه بر ایجاد سوبسترا مناسب به لحاظ نسبت کربن: نیتروژن یا کربن: نیتروژن: فسفر که عموماً ۱:۱۷ و ۲۰ :۱ :۰/۲ هستند برای استفاده به عنوان محیط‌کشت کاربرد بسیاری دارند (Delince, 1992).

اهداف مورد نظر در این تحقیق پس از جمع‌آوری، خالص‌سازی جلبک سبز *Chlorococcum*، بررسی تأثیر کودهای مرغی و گاوی به عنوان محیط‌کشت و مقایسه این کودها با سایر محیط‌کشتها از قبیل محیط‌کشت معمول BBM و عصاره خاک[1] با اندازه‌گیریهای زیست توده، میزان رشد و کلروفیل a در یک دوره پرورش بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های جلبکی با نمونه‌برداری آب از استخرهای پرورش ماهی انجام شد. سپس با استفاده از میکروپیپت، سلولهای فیتوپلانکتونی به طور ناخالص جدا شد و با بهره‌گیری از محیط‌کشت جامد آگار (Agar-Agar) و تجدید مداوم کشت ذخیره خالص جلبکی تهیه گردید. برای تهیه محیط‌کشت جامد به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ گرم آگار جامد به محیط‌کشت BBM (براساس روش Nichols (۱۹۷۳) اضافه شد. محیط‌کشت تهیه شده در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. آنگاه محلول حاصل به صورت مایع و تقریباً گرم و در شرایط ضدعفونی و استریل شده در پتری‌دیشهای پلاستیکی (۵۰ میلیمتری) ریخته و درب آن با پارافیلم بسته شد. پس از آنکه محیط‌کشت تهیه شده در دمای اتاق به حالت جامد تبدیل گردید، نمونه ناخالص تهیه شده از استخرهای پرورش ماهی روی محیط‌کشت قرار داده شد تا کلنی‌های جلبکی بعد از ۲۰ روز تشکیل شود. در مرحله بعد مشاهده جلبک خالص‌سازی شده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ میسّر شد و بعد از حصول اطمینان، کار پرورش آن با استفاده از محیط‌کشت مایع BBM انجام گردید. جلبک‌ها بعد از کشت‌های متوالی در لوله آزمایش، ارلن مایرهای ۵۰ میلی‌لیتری و ۱۰۰ میلی‌لیتری و به دست آوردن تراکم نسبتاً قابل ملاحظه‌ای از جلبک مورد نظر در ارلن مایرهای دو لیتری پرورش داده شد. جلبک کلروکوکوم مورد استفاده در این تحقیق از نظر مشخصات سلولی دارای ۱ تا ۳ کلروپلاست به همراه پیرونوئید فرد ستاره‌ای شکل و بندرت صفحه‌ای شکل بود. کلروکوکوم از محدود جلبکهای سبز است که در کشت‌های با مدت بیش از ۳۰ روز رنگ آنها بتدریج از سبز به نارنجی متمایل به زرد تغییر می‌یابد (Akiyama, 1977; Phang and Chu, 1999). اگرچه در این تحقیق تلاش شد که نام گونه کلروکوکوم نیز مشخص شود اما به لحاظ تفاوت‌های نزدیک سلول‌شناسی در این جنس از آوردن نام گونه خودداری و تنها به نام جنس اکتفا شد.

1. Soil Extract

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

عصاره کود مرغی و کود گاوی از طریق مخلوط کردن کود با آب مقطر به نسبت ۱ به ۵ تهیه گردید. کود مرغی مورد استفاده دارای ۴۲ درصد، ۱ درصد فسفر، ۱۴ درصد نیتروژن و کود گاوی دارای ۲۶ درصد کربن، ۰/۲ درصد فسفر و ۱۰ درصد نیتروژن بود. برای تهیه عصاره خاک، خاک با آب مقطر به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و اتوکلاو شد و به مدت ۷ روز به حالت ثابت گذاشته شد، سپس از کاغذ صافی عبور داده شد و مایع حاصل پس از سه روز نگهداری در استوانه، بخش رویهٔ آن به آرامی و با دقت جداسازی گردید تا به صورت عصاره خاک استفاده شود. خاک مورد استفاده دارای ۰/۵۲ درصد وزنی ماده آلی، ۰/۰۱ درصد وزنی نیتروژن و ۰/۰۱ درصد وزنی فسفر بود.

اندازه‌گیری کربن (ماده آلی) با استفاده از روش Wilkie و Black (۱۹۳۴) براساس اکسیداسیون مرطوب مواد آلی انجام شد (Black, 1982). اندازه‌گیری نیتروژن به روش Kjeldal (۱۹۶۵) با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ در دمای ۳۷۰°C تا هنگام تبدیل رنگ سبز به صورتی میسّر شد (Black, 1982). فسفر به روش Olson (۱۹۶۵) با به کارگیری اسید آسکوربیک به عنوان ماده احیاءکننده و به طریق کالریمتری با کمک اسپکتروفتومتر (۶۴۰۰ JENWAY) با قرائت میزان جذب در طول موج‌های ۸۸۰ نانومتر و ۷۲۰ نانومتر به دست آمد (Black, 1982).

به منظور ارزیابی میزان زیست‌توده و رشد جلبک کلروکوکوم، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ گرم در لیتر (کیلوگرم در مترمکعب) از کود مرغی و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ گرم در لیتر از کود گاوی به عنوان محیط‌کشت (تیمارهای آزمایشی) انتخاب شد و هر کدام با ۳ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی آزمایش (آزمایش اول) شدند. برای انجام آزمایش پس از اتوکلاو کردن آب شیرین (سختی کل معادل با ۴۵ میلی‌گرم در لیتر از کربنات کلسیم) فیلتر شده در ارلن مایرهای ۲ لیتری، کود در غلظت‌های مورد آزمایش به آنها اضافه شد و به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از ذخیره اولیه جلبک کلروکوکوم به هر تیمار اضافه گردید و آزمایش در شرایط کنترل شده در دمای ۱۸°C و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه (اندازه‌گیری شده با نورسنج مدل LI-COR LI-۱۸۹) و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (تنظیم شده با ساعت فرمان Fur Aussen-geeignet مدل IP۴۴، ساخت آلمان) انجام گردید. طول دوره آزمایش ۲۸روز بود که در روز آغازین و روز پایانی از تکرارهای هر تیمار، نمونه‌های جلبکی برای شمارش و اندازه‌گیری برداشته شد.

به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط‌کشت جلبک کلروکوکوم، آزمایش دوم در پنج تیمار شامل محیط کشت BBM، عصاره خاک + BBM (۵۰۰ میلی‌لیتر عصاره خاک به ۱۵۰۰ میلی‌لیتر BBM)، کود مرغی (۰/۸ گرم در لیتر)، کود گاوی (۰/۸ گرم در لیتر) و مخلوطی از تمام تیمارها (BBM + عصاره خاک + کود مرغی + کود گاوی به نسبت‌های مشابه) در سه تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفت. برای انجام آزمایش پس از اتوکلاو کردن آب شیرین (سختی کل معادل با ۴۵ میلیگرم در لیتر از کربنات کلسیم) فیلتر شده در ارلن مایرهای ۲ لیتری، کود در غلظت‌های مورد آزمایش به آنها اضافه شد و به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از ذخیره اولیه جلبکی به هر تیمار اضافه گردید و آزمایش در شرایط کنترل شده در دمای ۲۳°C و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی میسّر شد. طول دوره آزمایش ۱۵ روز بود که در روز آغاز و روز پایانی آزمایش از تمام واحدهای آزمایشی نمونه‌برداری‌های لازم انجام شد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

در این تحقیق شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام هموسیتومتری و با روش Martinez و Chakroff (۱۹۷۵)، بعد از تثبیت نمونه‌ها در محلول لوگل ایدین (مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در هر ۳ میلی‌لیتر نمونه) انجام شد. زیست توده خشک جلبکها با استفاده از روش Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) با توزین حجم معینی از جلبک‌های شمارش شده به دست آمد. اندازه‌گیری کلروفیل a نمونه‌ها پس از فیلتراسیون نمونه‌ها و افزودن استون و سانتریفیوژ آنها با قرائت میزان جذب نمونه‌ها به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۴، ۶۴۷ و ۶۳۰ نانومتر با روش Parsons و همکاران (۱۹۸۴) میسّر شد. سپس میزان کلروفیل a با استفاده از رابطه $a\text{ کلروفیل} = 11.85(OD_{664}) - 1.54(OD_{647}) - 0.08\ (OD_{630})$ محاسبه گردید.

میزان رشد ویژه (*SGR*) با استفاده از رابطه $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1)/\Delta t$ محاسبه شد که در آن N_2 تعداد سلولهای جلبک در انتهای آزمایش و N_1 تعداد سلولهای جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984). زمان دو برابر شدن (D_t) جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه $D_t = \ln 2 / SGR$ محاسبه گردید (Omori and Ikeda, 1984).

آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک طرفه[1] پس از حصول اطمینان از مفروضات تجزیه واریانس انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنادار ۵٪ استفاده شد (Zar, 1984). کارهای آماری لازم با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید (SPSS, 2002).

نتایج

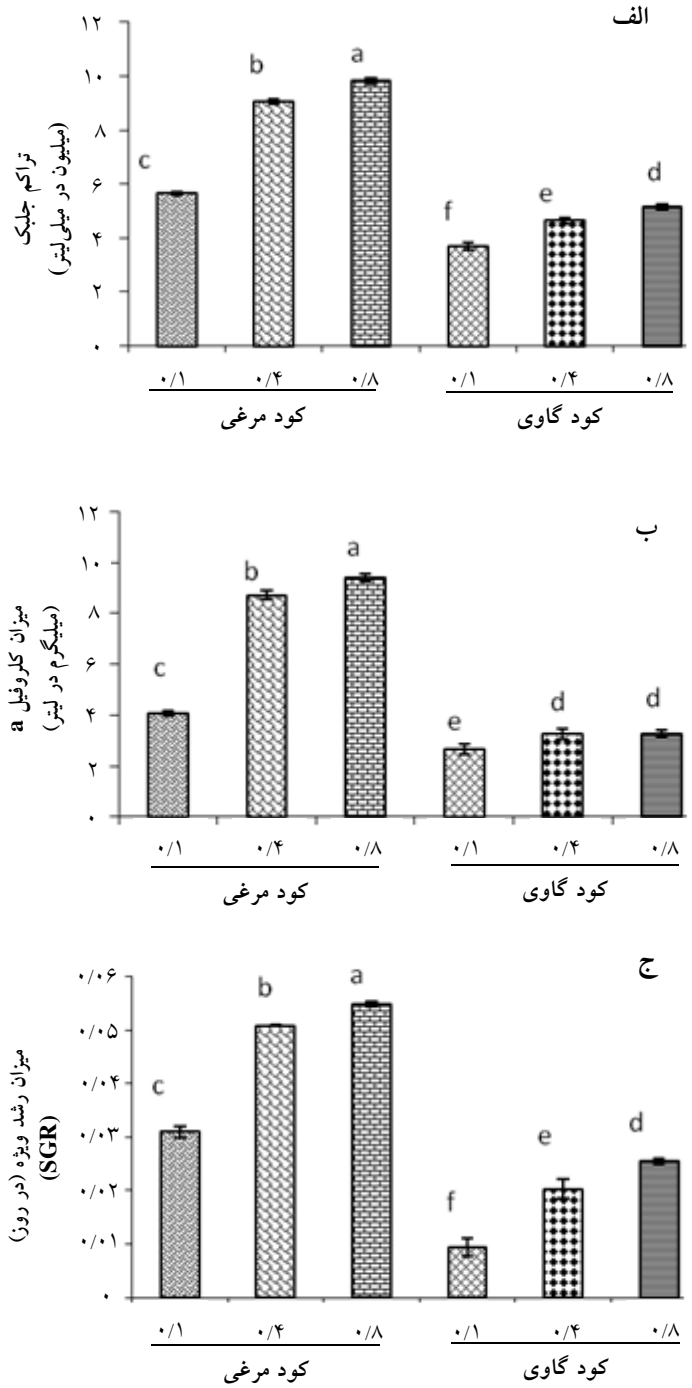
نتایج آزمایش کودهای مرغی و گاوی در غلظت‌های مختلف نشان داد که ظروف کشت دارای ۰/۸ گرم در لیتر از کود مرغی بیشترین میانگین تعداد سلول جلبکی ($۸۷/۱\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر) را داشت که اختلاف معناداری با سایر تیمارهای آزمایشی داشت (نمودار۱- الف). میزان کلروفیل a در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر از کود مرغی به مقدار ۹/۴ میلی‌گرم در لیتر رسید درحالی که این میزان در تیمار ۰/۱ گرم در لیتر از کود گاوی ۲/۶ میلی‌گرم در لیتر بود (نمودار۱- ب). اندازه‌گیری میزان رشد ویژه (*SGR*) در پایان دوره آزمایش (روز ۲۸ پرورش) نشان داد که رشد با توجه به میزان کودهای مرغی و گاوی دامنه‌ای از ۰/۰۰۹ تا ۰/۰۵۴را دارد (نمودار۱- ج). به طور کلی می‌توان بیان کرد که مناسب‌ترین عملکرد شاخصهای رشد و تولید زیست توده جلبک کلروکوکوم در تیمار ۰/۸ کود مرغی به دست آمد.

نتایج شمارش و تخمین جمعیت جلبک کلروکوکوم در مقایسهٔ محیط‌کشت‌های مختلف (آزمایش دوم) در نمودار ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که حداکثر میانگین تراکم جمعیت در روز ۱۰ پرورش بود و از روز ۱۰ به بعد جمعیت کاهش یافت. همچنین مقایسه نتایج نشان داد که تیمار BBM + عصاره خاک اختلاف معناداری به لحاظ تولید زیست‌توده و رشد با سایر محیط‌کشت‌ها دارد ($P<۰/۰۵$). بالاترین میانگین تعداد سلول از تیمار BBM + عصاره خاک ($۱۱/۶\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر) و پایین‌ترین میانگین تعداد سلول از تیمار ۰/۸ گرم در لیتر از محیط‌کشت تهیه شده از عصاره کود گاوی ($۵/۱\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آمد (نمودار۳- الف). ماکزیمم میانگین زیست توده خشک جلبک کلروکوکوم با کشت این جلبک بر محیط کشت BBM + عصاره خاک (۰/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ماکزیمم میانگین کلروفیل a (۱۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد (نمودار۳- ب و ج).

1 . One-Way ANOVA

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

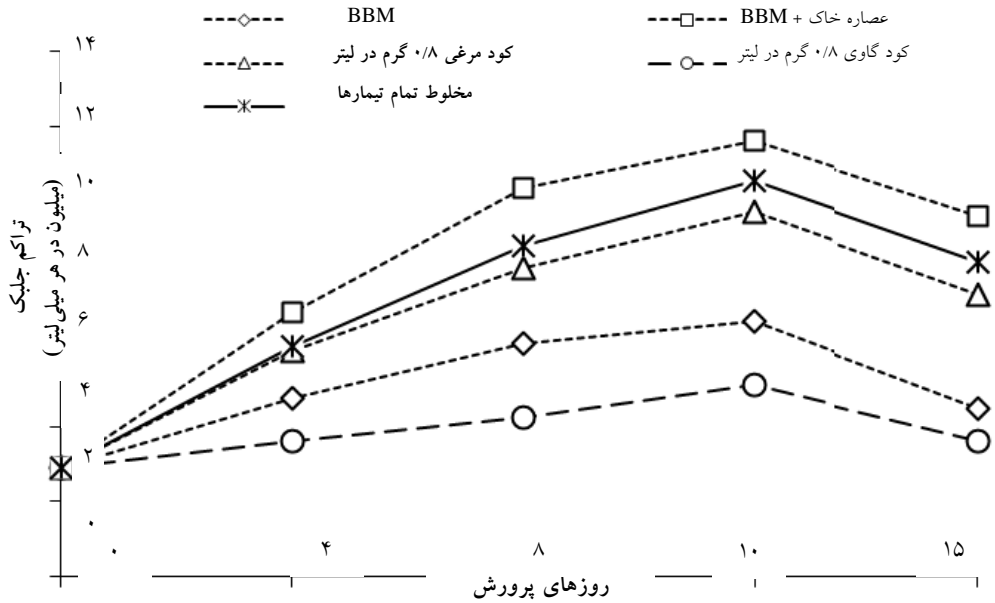


نمودار ۱ میانگین (خطای استاندارد ±) الف: تراکم جلبکی، ب: میزان کلروفیل *a* ج: میزان رشد ویژه (SGR) در جلبک کلروکوکوم پرورش یافته در تیمارهای مختلف از کودهای مرغی و گاوی مورد آزمایش

در هر نمودار حروف مشخص شده که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند (P>۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]



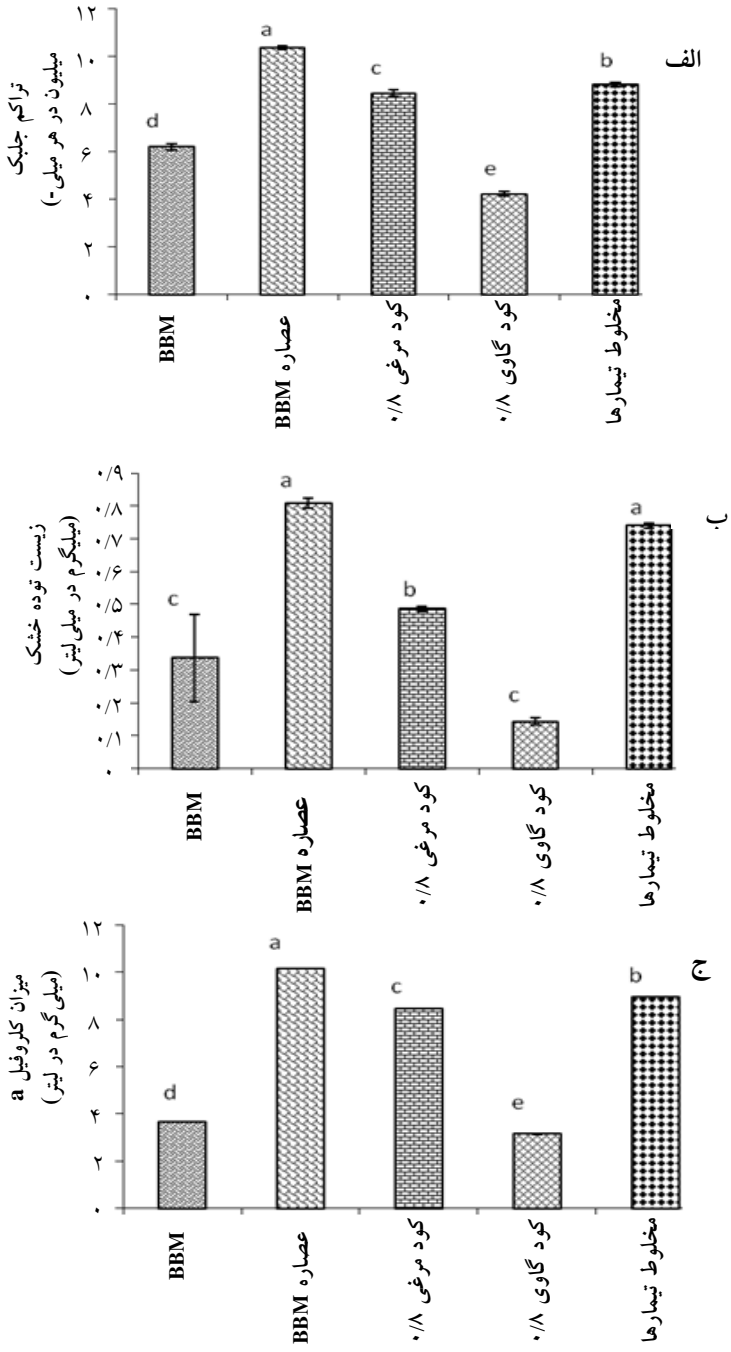
نمودار ۲ تغییرات تراکم جمعیت کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی در روزهای پرورش
داده‌ها میانگین سه تکرار در هر تیمار می‌باشند

در این تحقیق بالاترین میانگین میزان رشد ویژه ۰/۱۳۹ در روز به دست آمد که حاصل پرورش جلبک کلروکوکوم با استفاده از محیط کشت BBM + عصاره خاک بود و به دنبال آن به میزان رشد ویژه ۰/۱۲۹، ۰/۱۲۱، ۰/۰۸۵ و ۰/۰۵۶ در روز به ترتیب در تیمار مخلوط، ۰/۸ گرم در لیتر کود مرغی، BBM (شاهد) و تیمار ۰/۸ گرم در لیتر کود گاوی قرار داشت (نمودار ۴- الف). بر اساس این می‌توان محاسبه و بیان کرد که زمان دوبرابر شدن جمعیت کلروکوکوم در شرایط آزمایش انجام شده، در محیط‌کشت‌های گوناگون متفاوت است و دامنه‌ای از ۴/۹۷ تا ۱۲/۱۶ روز را داشت. کوتاه‌ترین زمان در تیمار BBM + عصاره خاک و طولانی‌ترین زمان در تیمار کود گاوی است (نمودار۴- ب).

با توجه به یافته‌های این آزمایش می‌توان گفت که تیمار عصاره خاک + BBM به لحاظ تولید زیست توده، میزان رشد ویژه و میزان کلروفیل a مناسب‌ترین عملکرد را در مقایسهٔ محیط‌کشتهای آزمایش شده برای جلبک سبز کلروکوکوم دارد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

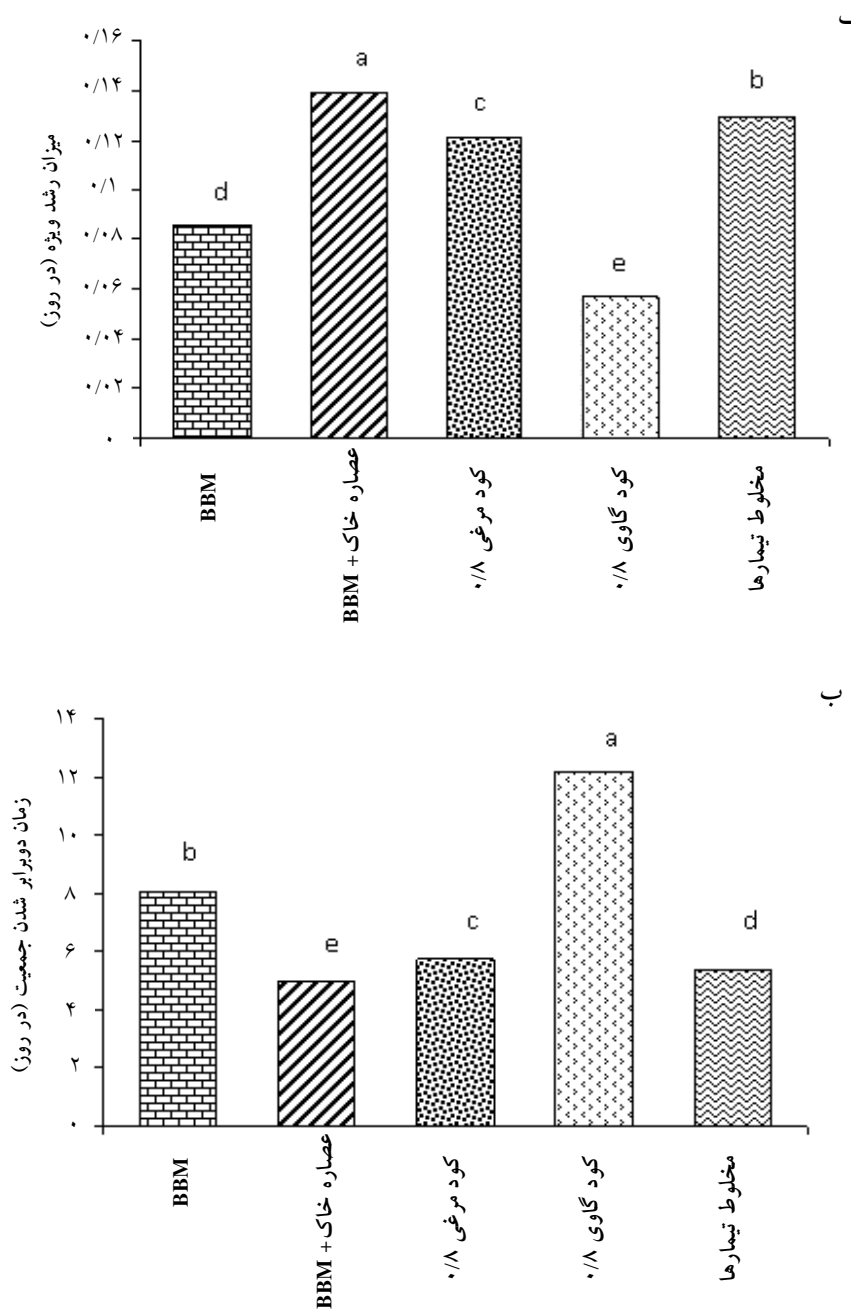
[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]



نمودار ۳ میانگین (خطای استاندارد ±) الف: تعداد سلول، ب: زیست توده خشک، ج: کلروفیل *a* بعد از ۱۰ روز پرورش جلبک *Chlorococcum* حروف مشخص شده در هر نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند (P>۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]



نمودار ۴ میانگین (خطای استاندارد ±) الف: میزان رشد ویژه (SGR)، ب: زمان دو برابر شدن جمعیت جلبک کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی حروف مشخص شده در هر نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معناداری ندارند($P>0/05$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

بحث

کودهای آلی به عنوان محیط‌کشتهای جلبکی در افزایش رشد و زیست توده جلبکهای میکروسکوپی ازقبیل کلرولا، سندسموس و کلروکوکوم به لحاظ ارزان و قابل دسترس بودن و سهولت استفاده اهمیت ویژه‌ای دارند. در این مطالعه بهترین عملکرد جلبک سبز کلروکوکوم در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر از کود مرغی حاصل شد. درخصوص مناسب بودن کود مرغی نسبت به کود گاوی، Becker در سال ۱۹۹۴ بیان کرد کود مرغی با غلظت ۰/۵گرم در لیتر عملکرد مناسب‌تری در رشد ویژه (۰/۷۱ در روز) در مقایسه با کود گاوی (۰/۴۲ در روز) و کود خوکی (۰/۴۳ در روز) در جلبکهای میکروسکوپی دارد. براساس گزارش Delince در سال ۱۹۹۲، کود مرغی ۳۷۶۶ تا ۵۰۲۱ کیلوژول بر کیلوگرم و کود گاوی ۲۵۱۰ تا ۳۳۴۷ کیلوژول بر کیلوگرم انرژی دارند. همچنین او نشان داد که کود مرغی دارای ۱۴ تا ۲۵٪ و کود گاوی دارای ۱۰ تا ۱۵٪ نیتروژن پروتئینی است. به طور کلی کود گاوی به دلیل داشتن حدود کمتر از ۱٪ پپسین، کمتر از ۱٪ نشاسته و کربوهیدرات و بیش از ۶۵٪ فیبر و انرژی کمتر از ۳۳۴۷ کیلوژول بر کیلوگرم، ارزش غذایی کمتری دارد (Schroeder, 1987) . از سوی دیگر نسبت رطوبت در کودهای مرغی نسبت به کودهای گاوی کمتر است و میزان نیتروژن و فسفر آن حدوداً دو برابر بیشتر از کود گاوی می‌باشد (Little & Muir, 1987).

از نظر کیفیت آب، کودهای آلی اگرچه به روشهای گوناگون بر کیفیت آب تأثیر دارند، اما به طور عمده بر میزان مواد مغذی تأثیر دارند که در صورت متعادل بودن غلظت آنها نه تنها زیان‌آور نیستند بلکه موجب تداوم چرخهٔ حیات در آبها از طریق فرایند تولید اولیه می‌شوند. آمونیاک در استخرهای کوددهی شده به میزان ۰/۱۶ تا ۱/۲۴ میلیگرم در لیتر در محیطهای آبی و آمونیوم به میزان ۰/۵۶ تا ۹/۲۸ میلیگرم در لیتر نیز می‌رسد (Buck et al., 1978; Edwards et al., 1981). میزان نیترات آب در هنگام استفاده از کودها پایین می‌ماند و کمتر از ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر (Buck et al., 1978و ۰/۱۵ تا ۰/۸۳ میلیگرم در لیتر (Edwards et al., 1981) می‌باشد که این مقادیر تأثیر زیان‌آوری بر محیط زیست ندارند. استفاده از جلبکهای میکروسکوپی از قبیل کلروکوکوم می‌تواند در جذب ترکیبات مغذی کودها در آبها مفید باشد.

علاوه بر کودهای آلی از سایر محیط‌کشتهای معدنی نیز در پرورش جلبکها استفاده می‌شود. برای مثال McNuff در سال ۲۰۰۷ در پرورش جلبک سبز کلروکوکوم از محیط‌کشت Chalkley's Medium همراه با عصاره خاک استفاده کرد. Yuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ از محیط کشت BBM استفاده و بیان کردند که پس از گذشت ۷ روز از پرورش برای اینکه زیست توده جلبکی به رشد خود ادامه دهد، ۰/۳٪ گلوکز به محیط BBM اضافه شد که موجب افزایش رنگدانه‌ها برای فتوسنتز در جلبک کلروکوکوم گردید. در این مطالعه تأثیر عصاره خاک در بهبود محیط‌کشت بررسی شد و مشخص گردید که عملکرد مناسبی را در ترکیب با محیط‌کشت BBM بر زیست توده و رشد جلبک کلروکوکوم دارد.

در این مطالعه میزان کلروفیل *a* در مناسب‌ترین شرایط ۹/۴۲ تا ۱۰/۱۵ میلیگرم در لیتر بود. به لحاظ مقایسه‌ای می‌توان بیان کرد که میزان کلروفیل و تولید در محیطهای غنی‌شده با کودها افزایش می‌یابد. Msiska و Cantrell (۱۹۸۵) نشان دادند که استفاده از کود مرغی در استخرهای سیمانی موجب تولید کلروفیل *a* تا حدود ۸۰ میکروگرم در لیتر می‌شود. همچنین Norega-Curtis در سال ۱۹۷۹ بیان کرد استفاده از کود گاوی در میزان ۷۰ کیلوگرم در هکتار در روز موجب تولید ۲/۱ تا ۱۰/۶

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

میکروگرم در لیتر کلروفیل *a* می‌شود که بسیار کمتر از مقدار بیان شده در رابطه با کودهای مرغی است. براساس گزارش Buck در سال ۱۹۷۸، استفاده از ۴۰ تا ۷۰ کیلوگرم کود کبوتری در هر هکتار در روز موجب تولید اولیه ۱۵۰۰۰ ارگانیسم در هر میلی‌لیتر یا معادل با ۱۲۵ میکروگرم کلروفیل *a* در هر لیتر می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر ایجاد شرایط مناسب برای این تحقیق کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم

منابع

1. Akiyama, M. 1977. Illustrations of the Japanese Fresh-water Algae, Uchidarokakuho Publishing Company, Tokyo, Japan, 933p.
2. Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Taylor and Francis Group, 320 p.
3. Becker, E. W., 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, 293 p.
4. Black, C. A., 1982. Method of Soil Analysis, Vol. 2, Chemical and Microbiological Properties, American Society, 211p.
5. Bold, H. C. and Parker, B. C. 1962, Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species; *Archives Mikrobiology*, 42: 267-88.
6. Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1988. *Dunaliella*. In: Microalgal Biotechnology, Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK; pp. 27-58.
7. Brown, T. E., Richardson, F. L., Vaughn, M. L. 1967. Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales), *Phycologia*, 6: 167-184.
8. Buck, D. H., Baur, R. J., Rose, C. R. 1978. Utilization of swine manure in a polyculture of Asian and North American fishes, *Transition American Fish Society*, 107:216-222.
9. Delince, G. 1992. The ecology of the fish pond ecosystem, Kluwer Academic Publishers. London, 230 p.
10. Demirbas, A. and Demirbas, M. F. 2010, Algae energy: Algae as a new source of biodiesel, Springer, 199 p.
11. Demirbas, A. 2006. Biogas potential of manure and straw mixtures, Energy Sources Part A, 28: 71-78.
12. Demirbas, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels, *Progress in Energy and Combustion Science*, 33: 1-18.
13. Demirbas, A. 2008. Recent progress in bio renewable feedstock's, *Energy Education Science and Technology*, 22: 69-95.
14. Edwards, P., Sinchumpasak, O. A., Tabucanon, M. 1981. The harvest of microalgae from the effluent of a sewage fed high rate stabilization pond by *Tilapia nilotica*; Part 2: studies of the fish ponds; *Aquaculture*, 21: 107-147.
15. Hall, D. O., Rosillo-Calle, F., Williams R. H., Woods, J. 1993. Biomass energy supply and prospects, In: Johansson, T. B., Kelly, H., Reddy, A. K. N. and Williams R.H. (eds.); Renewable Energy: Sources for Fuel and Electricity. Island Press, Washington, D.C., pp. 593-651.
16. Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, *FAO Fisheries Technical Report*, 295p.
17. Lee, Y. K. and Pirt, S. J. 1981. Energetics of photosynthetic algal growth: influence of intermittent illumination in short (40s) cycle, *Journal of General Microbiology*, 124: 433-52.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

18. Little, D. and Muir, J. 1987. A guide to integrated warm water aquaculture, Publishing Institute Aquaculture, University of Sterling, Sterling, U. K., 224 p.
19. Martines, M. P. and Chakroff, J. B. P. 1975. Direct phytoplankton counting technique using the hemacytometer, Philippine Agricultural Scientist, 59:43-50.
20. McNuff, B. 2007. *Hypsibius dujardini* collection notes and culture protocol, British National Grid, Ref. SD., 741078.
21. Msiska, O. V. and Cantrell M. A. 1985. Influence of poultry manure on growth of *Oreochromis shiranus chilwae*; *Aquaculture*, 44: 67-73.
22. Nichols, H. W. 1973. Growth media–freshwater, In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-24.
23. Noriega-Curtis, P. 1979. Primary productivity and related fish yield in intensely manured fishponds, *Aquaculture*, 17: 335-344.
24. Omori, M. and Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology, John Wiley and Sons Inc, New York, 332 p.
25. Phang, S. M. and Chu, W. L. 1999. University of Malaya Algae Culture Collection (UMACC): Catalogue of Strains, Institute of Postgraduate Studies & Research University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 77 p.
26. Parsons, T. R., Maita, Y., Lalli, C. M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, Pergamon Press, Oxford.
27. Schroder, G. L. 1987. Carbon and nitrogen budgets in manured fish ponds, *Aquaculture*, 62: 259-279.
28. Yuan J. P., Chen F., Liu Xin Li, X. Z. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*, Food Chemistry, 76: 319–325.
29. Zar, J. H. 1984. Bioststistical analysis, 2nd edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York, USA, 718 p.
30. Zhang, D. H., Lee, Y. K., Phang, S. M. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp., *Journal of Applied Phycology*, 9: 147-155.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]

Biomass and growth of green algae *Chlorococcum* sp. using organic manures and soil extract

Omidvar Farhadian[1*], Seyed Mojtaba Fallahi[2] and Nasrollah Mahboobi Soofiani[3]

1. Assistant Prof. of Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
2. M.Sc. of Fisheries Science, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
3. Associate Prof. of Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

*Corresponding author: omfarhad@cc.iut.ac.ir, farhadyo@yahoo.com

Abstract: In order to determine effects of chicken and cattle manures in culture of *Chlorococcum*, an experiment was designed in six treatments including; 0.1, 0.4, 0.8 g/l of chicken manure and 0.1, 0.4, 0.8 g/l of cattle manure as completely randomize design with three replicates for 28 days. Results showed that the mean maximum density (87.1×10^5 cell/ml), specific growth rate (0.054 day^{-1}), algal dry biomass (0.644 g/l), and chlorophyll *a* (9.42 mg/l) were obtained with 0.8 mg/l chicken manure. In order to compare performance of these manures with other culture media, second experiment with five treatments including; BBM (control) (Bold's Basal Medium), BBM + soil extract, 0.8 g/l chicken manure, 0.8 g/l cattle manure and mixture of all treatment (BBM, BBM + soil extract, chicken manure and cattle manure) was designed as completely randomize design with three replicates for 15 days. Comparative results showed that BBM + soil extract had highest algal density (11.6×10^6 cells/ml), highest algal dry biomass (0.81 mg/ml), maximum SGR (0.13 /day), highest chlorophyll a (10.15 mg/l) and minimum doubling time (4.97 days). In conclusion, performance of BBM + soil extract was better in terms of biomass and growth parameters of *Chlorococcum*.

Keywords: Green algae *Chlorococcum*, BBM medium, Chicken and cattle manures, Soil extract, Specific growth rate, Biomass, Chlorophyll *a*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-07-28]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1391.1.1.1.8]